UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

398

O. VERONA - O. ZARDETTO DE TOLEDO

Intorno ad un lievito osmofilo sistematicamente prossimo a *Sacch. elegans* Lodder et Kreger-van Rij

Estratto da « Mycopathologia et Mycologia Applicata »
vol. XI, 1959

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1960

SEPARATUM

Vol. XI 15-IX-1959 Fasc. 1-2

MYCOPATHOLOGIA

ET

MYCOLOGIA APPLICATA

FUNDATORES:

R. CIFERRI

P. REDAELLI

EDENDA CURAVIT:

TIBOR BENEDEK

Chicago, Ill.

EDITORES:

F. de Almeida, São Paulo — A. N. Aravysky, Leningrad — A. E. de Arêa Leão, Rio de Janeiro — E. Baldacci, Milano — J. Bánhegyi, Budapest — F. Baudys, Brn — A. L. van Beverwijk, Baarn — K. B. Boedijn, The Hague — S. R. Bose, Calcutta — Wm. Bridge Cooke, Cincinnati, Ohio — H. Campins, Barquisimeto, Venezuela — A. L. Carrión, San Juan, P. R. — A. Castellani, Lisboa — A. Catanei, Alger — K. Cejp, Praha — A. Chaves Batista, Pernambuco — A. Ciccarone, Bari — N. F. Conant, Durham, N. C. — J. N. Couch, Chapel Hill, N. C. — J. Coudert, Lyon — S. N. Dasgupta, Lucknow — E. D. Delamater, Philadelphia — C. W. Dodge, St. Louis Mo. — C. W. Emmons, Washington, D.C. — G. Falchi, Pavia — E. Fejér, Budapest — G. W. Fischer, Pullman, Wash. — G. Florenzano, Firenze — A. da Fonseca, Rio de Janeiro — N. Fries, Uppsala — A. Gonzalez Ochoa, Mexico, D.F. — H. Götz, München — L. Grigoraki, Marseille — E. I. Grin, Sarajevo — E. Hazen, Albany N.Y. — T. Hemmi, Kyoto — S. Ito, Sapporo — D. Janke, Marburg/Lahn — J. Jørstad, Oslo — P. N. Kashkin, Leningrad — F. D. Kern, State College, Pa — A. M. Kligman, Philadelphia, Pa. — C. da Silva Lacaz, São Paulo — J. Lodder, Delft — J. E. Mackinnon, Montevideo — O. de Magalhaes, Belo Horizonte — A. v. Mallinkrodt-Haupt, Köln — P. Martens, Louvain — D. S. Martin, Durham, N.C. — J. Meyer, Strasbourg — M. Pereiro Miguens, Santiago de Compostela — J. H. Miller, Athens, Ga. — R. Morquer Toulouse — E. M. Mrak, Berkeley, Calif. — J. A. Nannfeldt Upsala — P. Negroni, Buenos Aires — F. L. Niño, Buenos Aires — J. Obrtel, Praha — T. Ørskov, København — Pereira Filho, Porto Alegre — B. Peyronel, Torino — A. Pijper, Pretoria — A. Pilat, Praha — P. Pinetti, Cagliari — A. Pinto Viegas, Campinas — J. Politis, Athènes — G. Pollacci, Pavia — V. Puntoni, Roma — T. Rayss, Jerusalem — I. Reichert, Rehovot — F. Reiss, New York — E. Rivalier, Paris — D. P. Rogers, Urbana, Ill. — K. Sakaguchi, Tokyo — R. Sartory, Strasbourg — G. H. Scherr, Chicago — J. Schwarz, Cincinnati — F. J. Seaver, Winter Park, Fla. — G. Ségretain, Paris — R. Singer, Tucuman — A. H. Smith, Ann Arbor, Mich. — F. K. Sparrow, Ann Arbor, Mich. — J. A. Stevenson, Beltsville, Md. — Y. Takahashi, Sendai — R. V. Talice, Montevideo — M. J. Thirumalachar, Pimpri, Poona — A. Trotter Vittorio Veneto — N. van Uden, Lisboa — A. C. Ukil, Calcutta — R. Vanbreuseghem, Anvers — C. Vermeil, Tunis — O. Verona, Pisa — G. A. de Vries, Baarn — S. A. Waksman, New Brunswick, N. J. — J. Walker, London — L. E. Wehmeyer, Ann. Arbor, Mich. — R. G. Werner, Nancy — J. Westerdijk, Baarn.

O. Verona & O. Zardetto de Toledo

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Universita' - Pisa)

INTORNO AD UN LIEVITO OSMOFILO SISTEMATICAMENTE PROSSIMO A SACCH. ELEGANS LODDER ET KREGER-VAN RIJ

UITGEVERIJ Dr. W. JUNK — DEN HAAG — 1959

INTORNO AD UN LIEVITO OSMOFILO SISTEMATICAMENTE PROSSIMO A SACCH. ELEGANS LODDER ET KREGER-VAN RIJ

O. Verona & O. Zardetto de Toledo

(*Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Universita' - Pisa*)

(9.II.1959)

Studiando una serie di lieviti isolati da uva raccolta nei pressi di Campinas nello Stato di S. Paolo in Brasile, due ceppi ci hanno lasciato, dal punto di vista sistematico, un poco perplessi. Si è proceduto, pertanto, ad uno studio di dettaglio, studio che si è portato su quattro isolati monocellulari ottenuti da uno dei ceppi. Indicheremo tali isolati con le lettere A-B-C-Z.

DESCRIZIONE TECNICA

Sviluppo in malto

Dopo 3 giorni a 26° C. cellule subovali od ovali misuranti nell' isolato A $\mu(3.6—4.8) \times (3.6—7.2)$ con presenti cellule anche più lunghe fino a μ 9.6, ma rare; negli altri isolati cellule ovalari di $\mu(3.6—4.8) \times (3.6—7.2)$.

Sedimento, talvolta flocculoso, al fondo; liquido limpido; non velo; possibile formazione di anello non continuo nelle vecchie colture.

Sviluppo in agar-malto

Dopo 3 giorni a 26° C. cellule subovali od ovali di $\mu(3.6—6) \times (3.6—7.2)$ od anche un poco più lunghe nell'isolato A e $\mu(3.6—4.8) \times (4.8—7.2)$ negli altri. Nelle vecchie colture, specie il ceppo A, dà origine a cellule spesso provviste di tubuli. Sviluppo non rapido di vegetazione non molto estesa, pastosa, bianco-giallastra, generalmente liscia.

Colture su lamina

Microcolture su agar-patata non rivelano formazione di vero pseudomicelio, ma solo tenui formazioni arbuscolari.

Sporulazione

Facile ed abbondante anche in agar-malto. Nell'isolato A gli aschi si formano in prevalenza previa copula isogamica. Contengono 1—2 od anche 3 spore globose, più difficilmente ovoidi, di μ 3.2—3.8, con spesso una goccia oleosa. Negli isolati B-C-Z si ha copula

Fig. 1. *a*) giovani cellule in malto; *b*) cellule in vecchie colture in agar-malto; *c*) cellule sporificate.

isogamica come in A, ma anche formazione di aschi non preceduta da copula; in tal caso gli aschi possono contenere anche 4 spore.

Fermentazione

glucosio	+		maltosio —
saccarosio	+	(o —)	lattosio —
galattosio	—		raffinosio —
			inulina —

La fermentazione del saccarosio merita alcuni chiarimenti.

Gli incerti risultati avuti usando i test standard hanno suggerito di ripetere più volte la prova anche in condizioni di diverso pH. Si è così tamponato il mezzo base a pH 5 e a pH 7 aggiungendo il saccarosio asetticamente al mezzo già sterile. Tanto, per evitare che anche tracce minime di saccarosio venissero invertite durante la sterilizzazione. Incubazione a 26° C., prove in triplo. I risultati avuti hanno consentito di poter stabilire che:

a) a pH 5 la fermentazione del saccarosio è sempre positiva verificandosi entro 1'8°—13° giorno, raramente più tardi;

b) a pH 7 la fermentazione del saccarosio, seguita per 30 giorni, può, in qualche caso, risultare negativa. Quando è positiva si svolge tuttavia con grande lentezza, cioè dopo 18—25 giorni dalla semina.

Riassumendo la fermentazione del saccarosio è positiva, se pure talvolta relativamente lenta, in mezzo acido. Può risultare negativa e comunque molto lenta a pH neutro.

Utilizzazione dei composti di C

glucosio	+		maltosio —
galattosio	—	(o poco)	lattosio —
saccarosio	+	(o —)	raffinosio —

inoltre:

xilosio	—	ribosio	—
arabinosio	—	inulina	—
sorbosio	+	glicerina	+
cellobiosio	—	mannite	+ (o poco)
ramnosio	—	dulcite	—

Assimilazione dei composti azotati

I nitrati non vengono assimilati. Positiva l'assimilazione di: solfato ammonico, urea, asparagina, peptone.

Utilizzazione dell'etanolo come unica sorgente di C

Sviluppo assente o molto scarso.

Scissione dell'arbutina: negativa.

Formazione di esteri: negativa.

Sviluppo in assenza di vitamine

Nel liquido di Williams senza vitamine lo sviluppo è moderatamente positivo; è migliore se presenti vitamine.

Sviluppo in soluzioni concentrate di zucchero

Positivo anche in mezzi contenenti gr. 80 di zucchero in cc. 100 di acqua di lievito.

Sviluppo a 37° C.: positivo.

Rendimento in alcool

In mosto d'uva l'attività fermentativa è già esaurita (a 25—26°C) all. '8°—10° giorno.

In un mosto contenente il 23.4 % di zucchero i quattro isolati dettero, al 20° giorno:

alcool etilico (in volume)	6.49 — 6.61 %
ac. volatile (in ac. acetico)	0.42—0.48 ‰

DISCUSSIONE

I quattro isolati non si dimostrano fondamentalmente diversi nonostante le dimensioni delle cellule appaiano, nell'isolato A, leggermente maggiori che negli isolati B-C-Z. Tutti gli altri caratteri, di contro, sono risultati uguali. E' vero, d'altronde, che tutti gli isolati provengono da un medesimo ceppo.

Per quanto si riferisce al riferimento sistematico la dimostrata capacità, dei nostri isolati, a svilupparsi in soluzioni molto concentrate di zucchero ci suggerì di procedere, in prima istanza, ad

un confronto con le specie qualificate „osmofile", comunque con le specie fermentanti il solo glucosio [1]) o glucosio e saccarosio.

In effetti, dal punto di vista morfologico e sporologico, i nostri isolati richiamano molto da vicino *Sacch. mellis* (FABIAN et QUINET) LODDER et KREGER-VAN RIJ, mentre da un punto di vista fisiologico ci è sembrato essere più vicini a *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ, lievito capace di svilupparsi, come noi abbiamo osservato, in presenza di elevate concentrazioni zuccherine e pertanto riferibile al gruppo degli osmofili.

Conseguentemente si è proceduto ad un confronto diretto con queste specie cortesemente forniteci dalla Signora Dr. KREGER-VAN RIJ che qui vivamente ringraziamo.

Invero, nonostante la simiglianza dei caratteri morfologici e sporologici, un ravvicinamento a *Sacch. mellis* non appariva molto giustificato dal momento che, *Sacch. mellis*, fermenta solo il glucosio.

Dovevamo però tener conto che SCARR, nel 1951 [2]), dava come possibile nei lieviti osmofili fermentanti il solo glucosio, una graduale inversione del saccarosio e questo a seguito di formazione di acidi.

Più giustificato appariva invece un accostamento a *Sacch. elegans* dato che questo fermenta sempre, sia pure molto lentamente, il saccarosio.

Il confronto diretto dei nostri isolati con *Sacch. mellis* e *Sacch. elegans* portò ai risultati che si trovano trascritti in Tabella e che indicano, come accennato, i molti punti di contatto con questa ultima specie.

Rispetto al tipo si notano comunque piccole differenze nei riguardi morfometrici. Quindi: *a*) nella fermentazione del saccarosio che nei nostri isolati può essere non lenta a pH 5 e molto lenta od anche negativa a pH 7; *b*) nella assimilazione del galattosio che *Sacch. elegans* assimila, se pure assai poco; *c*) nella possibilità, da parte dei nostri isolati, di utilizzare il sorbosio.

---

[1]) Nel gruppo dei lieviti fermentanti il solo glucosio si trovano, così distinte, le seguenti specie:

cellule misuranti	sviluppo lento	*S. mellis*
$\mu(2—5) \times (3—7)$	sviluppo normale	*S. bisporus*
cellule misuranti	coltura liscia	*S. acidifaciens*
$\mu(3—7) \times (5—15)$	coltura increspata	*S. baili*
		S. scandinavicus
		S. tellustris

Noi pensiamo che sarebbe interessante un più esteso esame comparativo di queste specie e ciò allo scopo di trovare elementi di maggiore differenziazione. Infatti, in base a questi soli caratteri — fermi ed uguali rimanendo tutti gli altri — in ordine a quanto oggi è acquisito in materia di variazioni si può rimanere perplessi nell'accettare come valide specie che tra loro differiscono o differirebbero solo per uno sviluppo più o meno veloce o l'aspetto liscio o rugoso delle vegetazioni in agar. Avendo tutte lo stesso abito morfologico, sporologico, zimologico ed auxologico, sarebbe forse biologicamente più esatto passarle a varietà di una unica specie. Sempre che, come si è detto, non sussistano altri caratteri differenziali.

[2]) SCARR, M. P.: J. gen. Microbiol., **5**, 704—713, 1951.

TABELLA

	forma e dimensioni (agar-malto) 3° g. a 26° C.	Fermentaz.ne del saccarosio	fermentaz.ne del rafflnosio	Assimilazione composti del carbonio						ureа, asparagina peptone, NH_4	sviluppo a 37° C.	sviluppo in soluzioni zuccherine concentrate
				galattosio	saccarosio	sorbosio	arabinosio xilosio ramnosio ribosio cellobiosio	glicerina mannite	etanolo			
S. mellis	rotonde di μ (2.6—5.2) × (3.4—6.2) e ovali di μ(2.6—4.5) × (3.5—10.5)	—	—	+ o —	—	—	—	+	—	+	+	+
S. elegans	ovali di μ(3.5—6) × (4.5—9)	+ ma molto lenta sia a pH 5 che a pH 7	+ (poco)	+ (poco)	+ (lento)	— o molto poco	—	+	— o poco	+	+	+
isolato A	subovali od ovali di μ(3.6—6) × (3.6—7.2) con rare cell. più lunghe	+ a pH 5 + o — sempre molto lenta a pH 7	—	— o molto poco	+	+ (o —)	—	+	— o poco	+	+	+
isolati B-C-Z	subovali di μ(3.6—4.8) × (3.6—7.2)	id.	—	— o molto poco	+	+ (o —)	—	+	— o poco	+	+	+

Almeno pro tempore crediamo di poter interpretare i nostri isolati come una varietà di *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ; Indichiamo questa varietà come:

Sacch. elegans LODDER et KREGER-VAN RIJ, var. *intermedia*, n. var. (pro tempore).

Riassunto

Viene descritto un lievito osmofilo, isolato da mosto d'uva naturale, tassonomicamente vicino a *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

Questo lievito viene riguardato come *Sacch. elegans* var. *intermedia* nov. var. (pro tempore).

Summary

Here is described an osmophilic yeast isolated from natural grape must which is taxonomically similar to *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

This yeast is regarded as *Sacch. elegans* var. *intermedia* nov. var. (pro tempore).

Resumo

Nêste trabalho descrive-se uma levedura osmofila isolada de môsto de uva natural taxonomicamente proxima a *Sacch. elegans* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

Esta levedura è considerada então, como *Sacch. elegans*, var. *intermedia* nov. var. (pro tempore).